

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭60-29658

⑬ Int. Cl.<sup>1</sup>G 01 N 27/46  
27/00  
27/30

識別記号

庁内整理番号

B-7363-2G  
6928-2G

⑭ 公開 昭和60年(1985)2月15日

F-7363-2G審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 尿素センサ

⑯ 特 願 昭58-138452

⑰ 出 願 昭58(1983)7月28日

⑱ 発 明 者 塩 野 悟 尼崎市塚口本町8丁目1番1号 三菱電機株式会社中央研究所内

⑲ 発 明 者 花 里 善 夫 尼崎市塚口本町8丁目1番1号 三菱電機株式会社中央研究所内

⑳ 発 明 者 中 子 真 美 子 尼崎市塚口本町8丁目1番1号 三菱電機株式会社中央研究所内

㉑ 出 願 人 三菱電機株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目2番3号

㉒ 代 理 人 弁理士 大岩 増雄 外2名

## 明 細 書

## 1 発明の名称

尿素センサ

## 2 特許請求の範囲

(1) 感光性樹脂を用いてウレアーゼ固定化膜をイオン感応面に結合した水素イオン感応性電界効果型トランジスタと、水素イオン感応性電界効果型トランジスタと、参照電極とを備えたことを特徴とする尿素センサ。

(2) ウレアーゼ固定化膜が、ウレアーゼを含む感光性樹脂を水素イオン感応性電界効果型トランジスタのイオン感応面に直接塗布硬化したものである特許請求の範囲第1項記載の尿素センサ。

(3) ウレアーゼ固定化膜が、フォトリソグラフィ技術を用いて水素イオン感応性電界効果型トランジスタのイオン感応面にパターンニングしてなる特許請求の範囲第2項記載の尿素センサ。

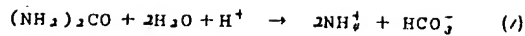
## 3 発明の詳細な説明

本発明は感光性樹脂を用いて水素イオン感応性電界効果型トランジスタ(pH-ISEFET)のイオ

ン感応面上にウレアーゼ固定化膜を形成せしめた新規な尿素測定用酵素センサに関するものである。

血液等の体液に含まれる尿素濃度の測定は、医療診断において肝臓機能や腎臓機能の異常を発見する上で重要な項目のひとつである。従来臨床検査においては、発色-吸光光度法やウレアーゼ分解-アンモニア比色定量法によつて体液中の尿素的定量が行われてきた。また近年では酵素反応と電極を組合せた酵素センサ法が各種提案され、前処理が不用、分析時間が短い、繰返し使用が可能等の種々の特徴をもつものとして数種類の尿素測定用酵素センサが提案されている。

次に尿素測定用酵素センサのひとつとして提案されているウレアーゼ固定化膜とアンモニア電極を組合せた形式のセンサについてその動作を説明する。この酵素センサはウレアーゼを包括固定化した膜やグルタルアルデヒドで架橋して固定化した膜をアンモニア電極の感応部に装着して製作することができるものである。試料液中の尿素はウレアーゼ固定化膜内で次式(1)に従つて分解される。



ウレアーゼ固定化膜内で生成した  $\text{NH}_4^+$  をアンモニア電極で定量できる。この原理に基づいて上記酵素センサは試料液中の尿素を定量することが可能である。

しかしながら従来の尿素測定用酵素センサでは、アンモニア電極を用いているため小型化が困難であること、従つてマルチセンサ（1個の素子で複数の基質に感応するセンサ）とすることが不可能であり、またウレアーゼ固定化膜を別途に調製後アンモニア電極に装着する必要がある製法が複雑である等の欠点があった。

本発明は上記のような従来のものの欠点を除去するためになされたもので、感光性樹脂を用いてウレアーゼ固定化膜を pH-ISPET のイオン感応面に直接形成することにより、小型化、マルチセンサ化が容易でかつ簡便な製法で作ることができる尿素センサを提供することを目的としている。

本発明は、感光性樹脂を用いてウレアーゼ固定

化膜をイオン感応面に結合した水素イオン感応性電界効果型トランジスタと、水素イオン感応性電界効果型トランジスタと、参照電極とを備えたことを特徴とする尿素センサである。

本発明では上記ウレアーゼ固定化膜を、ウレアーゼを含む感光性樹脂を pH-ISPET のイオン感応面に直接塗布硬化することができ、またフォトリソグラフィ技術により pH-ISPET のイオン感応面にパターンニングすることができる。

本発明では非常に小さい（数ミリ程度）pH-ISPET を用い、そのイオン感応面に限定してウレアーゼ固定化膜を形成させるので、感光性樹脂を用いて光照射箇所を限定することにより、必要な場所のみにウレアーゼ固定化膜を形成させることが可能である。

次に本発明による尿素センサを図によつて説明する。

第1図は本発明による尿素センサの下地電極とした pH-ISPET 素子の斜視図である。下地電極である pH-ISPET 素子1はソース2及び4、ド

レイン3及び5、擬似参照電極6、及びリード線7を備える。この pH-ISPET 素子はソース2とドレイン3からなる1個の pH-ISPET (A)、ソース4及びドレイン5からなるもう1個の pH-ISPET (B) 並びに（擬似）参照電極6から構成される複合型 pH-ISPET 素子である。この素子は通常の金属酸化物型電界効果トランジスタの製造法に準拠して製作できる。ここで擬似参照電極6は金の蒸着膜である。pH-ISPET (A) 及び pH-ISPET (B) は各々単独で水素イオンに感応するもので、ソース・ドレイン間に一定電圧をかけて両者の間を流れる電流を測定するか、又はソース・ドレイン間に一定電流を流すために必要なソース電圧を測定することによつて、溶液中の pH（水素イオン濃度）を測定することが可能である。

次に、pH-ISPET (A) の第2図8の部分にウレアーゼ固定化膜を装着し、もう一方の pH-ISPET (B) にはそれを装着しない方式で尿素センサを製作する。試料溶液中に尿素があれば前記の式(1)に従つて尿素が分解され、ウレアーゼ固定化膜内の pH

は、ウレアーゼ固定化膜のない pH-ISPET (B) でモニタされる試料溶液自体の pH と差を生じることになる。従つて、この尿素センサは2個の pH-ISPET (A) 及び (B) それぞれのソース・ドレイン間に一定電流を流すために必要なソース電圧を測定し、両 pH-ISPET のソース電圧の差動出力を増幅することによつて、試料溶液中の尿素濃度を測定することができる。

以下に実施例に基づき本発明を説明する。

#### 実施例 1

ポリビニルアルコールの水酸基に N-メチル-p-ホルミルスチリルピリジニウムメトサルフェートを付加した（付加率はポリビニルアルコールの水酸基に対して 0.8 モル%）感光性樹脂（市村、特開昭56-5761号に記載）の5重量%水溶液を調製した。この水溶液 0.2 ml にウレアーゼ 5mg を溶解し均一な溶液とした。この酵素・感光性樹脂混合水溶液を第2図中8の部分に示すように、ソース2とドレイン3から成る pH-ISPET のチャンネル部分すなわちイオン感応面をおおうよう

に広く塗布し、スピナーを用いて均一な膜にするとともに乾燥せしめた。次いで $340\text{ nm}$ 以下の波長の光をカットした $350\text{ W}$ の水銀灯を用い、5分間酵素・感光性樹脂混合物を光照射してウレアーゼ固定化膜を形成した。

以上のようにして作製した尿素センサの応答特性を、 $0.02\text{ M}$ りん酸緩衝液( $\text{pH}7.0$ )を用いて尿素濃度 $2\sim1000\text{ mg/L}$ の範囲で検討した。第3図に尿素濃度 $100\text{ mg/L}$ における本例尿素センサの応答曲線を図示する。第4図中曲線Aはこの尿素センサの検量線を示す。第3図からわかるようにこの尿素センサの応答は迅速であり、かつ第4図曲線Aからわかるように $10\sim1000\text{ mg/L}$ の範囲の尿素濃度に対して直線応答する。また検出下限は $1\text{ mg/L}$ であつた。またこのセンサの寿命を評価したところ、1日10回測定するという条件で30日経過後の出力低下は3%以下であり、寿命も充分長いものであつた。

#### 実施例 2

実施例1に述べた5重量%の感光性樹脂水溶液

$0.2\text{ M}$ に $20\text{ mg}$ のウレアーゼと $10\text{ mg}$ の牛血清アルブミンを加え均一な溶液とした。この溶液を実施例1と同様に、第2図に示したようにソース2とドレイン3から成る $\text{pH-ISPBT}$ のイオン感応面上にウレアーゼ固定化膜8を成膜した。次にこのウレアーゼ固定化膜の機械的強度を増大させる操作を行なつた。すなわち、25%のグルタルアルデヒド水溶液中にウレアーゼ固定化膜を15分間浸漬し、たん白質分子間を共有結合により相互架橋した。このウレアーゼ固定化膜を充分水洗し、さらに残存するグルタルアルデヒドを除くために0.1モル%のグリシン水溶液に15分間浸漬した。次いでこの尿素センサを水洗した。

このように製作した尿素センサの応答特性を $0.02\text{ M}$ のりん酸緩衝液( $\text{pH}7.0$ )を用いて評価した。第4図中曲線Bに示したものはこのセンサの検量線である。直線応答域、検出下限は実施例1とはほぼ同等であつたが、応答量は約半分となつた。なお寿命についても実施例1のものと同等であつた。

#### 実施例 3

実施例1に述べた5重量%の感光性樹脂水溶液 $0.2\text{ M}$ に5mgのウレアーゼを加え均一な溶液とした。この溶液を実施例1と同様に第2図に示したようにソース2とドレイン3からなる $\text{pH-ISPBT}$ のイオン感応面を覆うように塗布し、スピナーを用いて酵素・感光性樹脂混合物を均一な膜にするとともに乾燥せしめた。次いで第5図の9に示した部分にのみ光を照射するマスクを用いて、イオン感応面およびその周辺のみウレアーゼ固定化膜を形成した。光照射は実施例1で述べたものと同様の装置及び条件により行つた。

このようにしてイオン感応面にのみウレアーゼ固定化膜をパターンニングした尿素センサの応答特性や寿命は実施例1で述べたものと同等であつた。

以上の実施例では、感光性樹脂としてN-メチル-p-ホルミルスチリルピリジニウムメトサルフェートをペンダントに有するポリビニルアルコールを用いたが、ウレアーゼを失活せずに固定化

できる感光性のものであればいずれのものでも同様の効果を奏する。例えばポリエチレングリコールジメタクリレート(増感剤として例えばベンゾインエチルエーテルを加えたもの)、ポリビニルアルコール(架橋剤としてジアルド化合物を混合したもの)が使用できる。またゲート電圧を与えるものとして貴金属を用いたが、銀・塩化銀電極等の安定な参照電極を用いても良い。

以上のように本発明によれば、感光性樹脂を用いて $\text{pH-ISPBT}$ 上に直接ウレアーゼ固定化膜を形成したので、小型化、マルチセンサ化が容易でかつ製作法が簡便であり、さらに充分な寿命を有する尿素センサが得られる。

#### 4 図面の簡単な説明

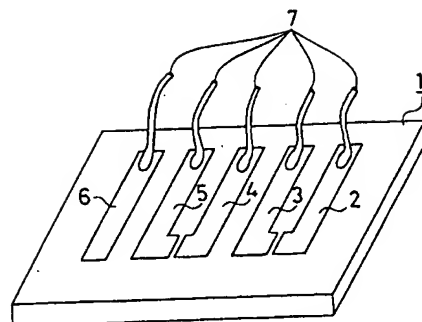
第1図は本発明による尿素センサの下地電極である $\text{pH-ISPBT}$ 素子の斜視図、第2図は本発明の一実施例による尿素センサの斜視図、第3図は第2図に示す本発明による尿素センサの応答曲線を示す線図、第4図は本発明の実施例1及び2における尿素センサの検量線、第5図は同じく本発

明の実施例3における尿素センサーの斜視図である。  
 図中、1・・・pH-ISFET素子、2,4・・・ソース、3,5・・・ドレイン、6・・・(疑似)参照電極、7・・・リード線、8,9・・・ウレアーゼ固定化膜。

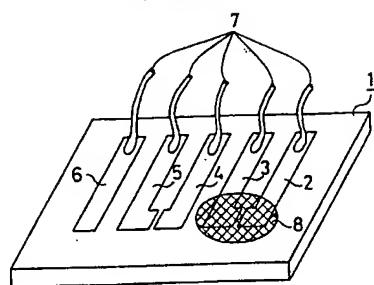
なお、各図中同一符号は同一または相当部分を示すものとする。

代理人 大 岩 増 雄

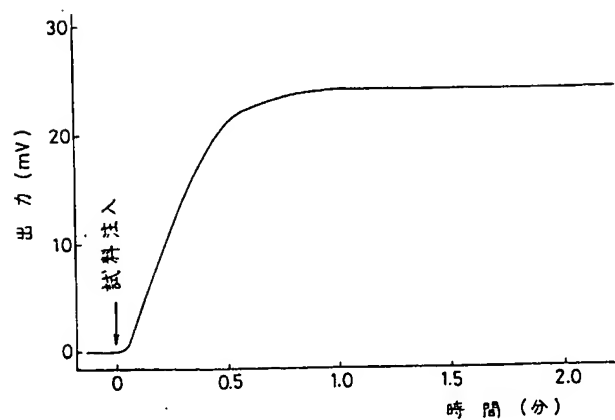
第1図



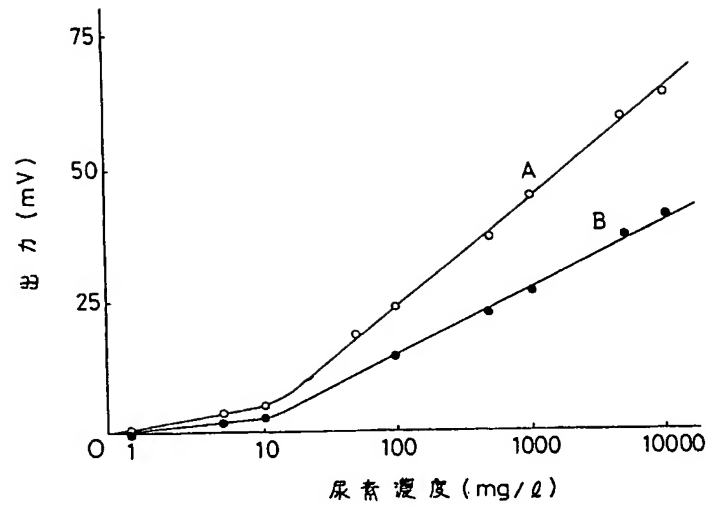
第2図



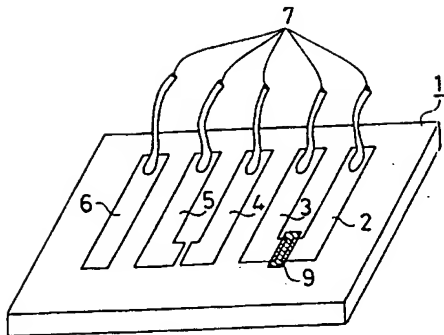
第3図



第4図



第5図



手続補正番「自発」

昭和 59 年 6 月 14 日



特許庁長官殿

1. 事件の表示 特願昭 58-138452号

2. 発明の名称  
尿素センサ

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人  
住所 東京都千代田区丸の内二丁目2番3号  
名称 (601)三菱電機株式会社  
代表者 片山 仁八郎

4. 代理人

住所 東京都千代田区丸の内二丁目2番3号  
三菱電機株式会社内

氏名 (7375)弁理士 大岩 増雄  
(連絡先 03(213)3111(466))

5. 補正の対象

- (1) 明細書の特許請求の範囲の欄
- (2) 明細書の発明の詳細な説明の欄
- (3) 明細書の図面の簡単な説明の欄

(別 紙)

## 6. 補正の内容

(1) 特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。

(2) 明細書をつぎのとおり訂正する。

ページ	行	訂 正 前	訂 正 後
4	9	パターンニング	パターンニング
5	1	擬 似	擬 似
5	5	(擬似)	(擬似)
5	8	擬 似	擬 似
10	11	マルチセンス	マルチセンス
11	3	(擬似)	(擬似)

## 特許請求の範囲

(1) 感光性樹脂を用いてウレアーゼ固定化膜をイオン感応面に結合した水素イオン感応性電界効果型トランジスタと、水素イオン感応性電界効果型トランジスタと、参照電極とを備えたことを特徴とする尿素センサ。

(2) ウレアーゼ固定化膜が、ウレアーゼを含む感光性樹脂を水素イオン感応性電界効果型トランジスタのイオン感応面に直接塗布硬化したものである特許請求の範囲第1項記載の尿素センサ。

(3) ウレアーゼ固定化膜が、フォトリソグラフィ技術を用いて水素イオン感応性電界効果型トランジスタのイオン感応面にパターンニングしてなる特許請求の範囲第2項記載の尿素センサ。